

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/17891 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/00**

[DE/DE]; Florastrasse 2, 13187 Berlin (DE). **BADER,**  
Michael [DE/DE]; Strasse 45, Nr. 35, 13125 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03178

(74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Str. 10,  
13125 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmelde datum:  
27. August 2001 (27.08.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 43 124.0 31. August 2000 (31.08.2000) DE

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-  
LARE MEDIZIN** [DE/DE]; Molekulare Medizin, Robert-  
Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WALTHER, Diego**

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING NEURONAL DISEASES AND FOR TREATING PRIMARY HEMOSTASIS DEFICIENCY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIK VON NEURONALEN ERKRANKUNGEN SOWIE ZUR BEHANDLUNG DER DEMENZENTEN PRIMÄREN HÄMOSTASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing neuronal diseases and for treating primary hemostasis deficiency. The invention further relates to a method for suppressing the immune system, which is inter alia significant for transplantation medicine and for the treatment of allergies. The invention is used in the field of medicine and in the pharmaceutical industry. The invention is worked according to the claims. The invention is based on the discovery that serotonin is synthesized by TPH isoenzymes that are differently expressed in the neurons in the peripheral tissues. Gene targeting was used to show that an isoform, the peripheral enzyme (referred to in the following as TPH), is responsible for maintaining primary hemostasis and T-cell mediated immune responses. Another isoform, the newly identified neuron-specific TPH (referred to as nTPH) synthesizes serotonin irrespective thereof in the central nervous system. The invention further relates to the newly identified neuronal tryptophane hydroxylase (nTPH) that differs from the TPH known so far in the regulatory domain.

A2

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beurteilt ein Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Suppression des Immunsystems, was u.a. für die Transplantationsmedizin und für die Behandlung von Allergien von Bedeutung ist. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Der Erfindung liegt die wesentliche Entdeckung zugrunde, dass Serotonin im Körper durch unterschiedlich exprimierte TPH-Isoenzyme in den Neuronen und in peripheren Geweben synthetisiert wird. Es wurde durch Gentargeting gezeigt, dass eine Isoform, das peripheres Enzym (weiterhin TPH genannt) für die Aufrechterhaltung der primären Hämostase und der T-Zell-vermittelten Immunantworten verantwortlich ist. Eine weitere Isoform, das neu identifizierte neuronenspezifische TPH (als nTPH bezeichnet) synthetisiert Serotonin unabhängig davon im ZNS. Gegenstand der Erfindung ist auch die neu gefundene neuronale Tryptophan-Hydroxylase (nTPH), die sich von der bisher bekannten TPH in der regulatorischen Domäne unterscheidet.

WO 02/17891

## Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Suppression des Immunsystems, was u. a. für die Transplantationsmedizin und für die Behandlung von Allergien von Bedeutung ist. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Mehrere Verhaltensstörungen wie Depressionen, Alkoholismus, Drogenmißbrauch, Schlaf- und Ernährungsstörungen sind eng verbundene Störungen des zentralen Nervensystems. Das Gewebehormon Serotonin spielt auf vielen Ebenen eine wesentliche Rolle. So ist Serotonin ein Neurotransmitter u. a. zur Anregung der Peristaltik, der Vasodilatation bzw. -konstriktion(dosisabhängig) und der Muskeltonussteigerung im Atmungstrakt. Es ist nicht nur ein Neurotransmitter im ZNS, sondern auch eine überall zu findende Verbindung in der Peripherie, wo Serotonin zuerst durch seine Aktivität als starker Gefäßverenger entdeckt wurde(Rapport et al., J. Biol. Chem. 176: 1237, 1948).

Außerdem spielt Serotonin eine entscheidende Rolle in der primären Hämostase, also der Blutungsstillung. Das in Blutplättchen gespeicherte Serotonin wird an Stellen vaskulärer Läsion ausgeschüttet, wonach es in die primäre Hämostase eingreift (Holland, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 32-39, 1976).

Weiterhin vermittelt das Serotonin der Blutplättchen auch zwischen Komponenten des Immunsystems (Geba et al., J. Immunol. 157: 557-565, 1996). Die Mechanismus, die dabei ablaufen, sind bisher unbekannt.

Es ist bekannt, daß das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TPH), ein Enzym, das in den Neuronen und im peripheren Gewebe exprimiert wird, den ausbeutebestimmenden Schritt in der Biosynthese von Serotonin katalysiert und damit entscheidend für die Funktionsfähigkeit des serotonergen Systems im ZNS und in der Peripherie ist.(Boadle-Biber, Prog. Biophys. Mol. Biol. 60: 1-15, 1993)

Es gibt bereits einige medizinische Anwendungen, die auf der Wirkung von Serotonin im Körper beruhen. Die vermehrte Freisetzung von Serotonin durch Rauwolfia-Alkaloide bzw. die Bremsung des Serotoninabbaus mit Hilfe von MAO (Monoaminoxidase)hemmern

werden zur Behandlung seelischer Depressionen genutzt, sein Antagonist Methysergid findet Anwendung in der Behandlung von Migräne.

Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, die Serotoninproduktion im Körper so gezielt zu beeinflussen, daß eine effektive Behandlung der oben genannten und anderer pathologischer Erscheinungen möglich ist.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Diagnose von neuronalen Erkrankungen der genannten Art zu verbessern. Eine weitere Aufgabe besteht darin, Mittel zur Behandlung der defizienten primären Hämostase sowie Mittel zur Suppression des Immunsystems auf der Basis neuer Erkenntnisse der Serotoninwirkung zu entwickeln,

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Der Erfindung liegt die wesentliche Entdeckung zugrunde, daß Serotonin im Körper durch unterschiedlich exprimierte TPH-Isoenzyme in den Neuronen und in peripheren Geweben synthetisiert wird. Es wurde durch Gentargeting gezeigt, daß eine Isoform, das periphere Enzym (weiterhin TPH genannt) für die Aufrechterhaltung der primären Hämostase und der T-Zell-vermittelten Immunantworten verantwortlich ist. Eine weitere Isoform, das neu identifizierte neuronenspezifische TPH (als nTPH bezeichnet) synthetisiert Serotonin unabhängig davon im ZNS.

Ferner konnten einige Mechanismen aufgeklärt werden. Es wurde gefunden,

- a) daß der Hauptschritt des Serotonins in der primären Hämostase durch den von Willebrandfaktor vermittelt wird. Weiterhin wurde festgestellt, daß
- b) das Serotonin in den Blutplättchen wesentlich für die normale Anzahl zirkulierender CD4+ Zellen, sowie für deren normale Aktivität ist und damit ein neues Ziel für eine immunsuppressive Behandlung darstellt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß zwei separat regulierte serotonerge Systeme im ZNS und in der Peripherie existieren, definiert durch die periphere Isoform TPH bzw. durch die neuronale Isoform nTPH. Dieser Befund ist ein entscheidender Beitrag zur Nutzung dieser Systeme im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Die Zweiteilung der Serotonin-Biosynthese auf molekularer Ebene ergibt unerwartete diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Das betrifft Korrelationen zwischen peripheren und zentral nervösen serotonergen Metaboliten. Das betrifft auch Möglichkeiten von diagnostischen Feinkorrelationen, denn die subtraktive Betrachtung der vorliegenden Metabolitenkonzentrationen erlaubt die Feststellung des ZNS an Metaboliten in der Peripherie. So kann die periphere Serotonin-Biosynthese vorübergehend spezifisch inhibiert werden, um anschließend die vom ZNS stammenden peripheren Metabolitenkonzentrationen zu bestimmen. Der Nutzen einer solchen diagnostischen Methode, gerade bei persistenten

psychiatrischen Störungen, sollte das vorübergehende Risiko von Blutungsepisoden und gestörter Zell-vermittelter Immunantworten überwiegen, da der feineren Diagnostik eine verbesserte Therapie folgen kann.

Gegenstand der Erfindung sind in erster Linie Inhibitoren bzw. Promotoren der beiden TPH-Isoformen, die zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase genutzt werden können. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Inhibitoren zur Suppression des Immunsystems, was u. a. für die Transplantationsmedizin und für die Behandlung von Allergien von Bedeutung ist.

Das Verfahren ist durch eine Beeinflussung der nTPH- und/oder TPH-Regulation und damit der gezielten Serotoninproduktion im Körper gekennzeichnet. Es wurde gezeigt, daß die periphere TPH für die primäre Hämostase und für die T-Zell-vermittelte Immunantwort notwendig ist, wohingegen die neu identifizierte nTPH, die unabhängig exprimiert wird und Serotonin im ZNS synthetisiert, für die serotonergen Effekte in der Verhaltensphysiologie verantwortlich ist. Dadurch ergeben sich neue pharmakologische Möglichkeiten zur Immunsuppression und zur therapeutischen Beeinflussung der Hämostase.

Die Beeinflussung der nTPH- und/oder TPH-Regulation erfolgt auf folgende Wegen:

Es werden spezifische Inhibitoren der peripheren TPH-Isoformen entwickelt, die auf den beschriebenen molekularen Unterschieden der TPH-Isoformen beruhen, andererseits auch Inhibitoren, die nicht Blut-Hirnschranken-gängig sind. Spezifische Inhibitoren für die TPH-Isoformen können *in vitro* durch recht einfache Standard-Screeningmethoden gefunden werden, da die erhaltenen cDNAs der beiden Isoformen mit Hilfe von Expressionssystemen zur gezielten Expression der reinen Isoformen verwendet werden können. Diesen Inhibitoren kommen neben dem diagnostischen Nutzen auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten zu, denn erhöhte Serotonin-Spiegel im Blut werden bei einer Vielzahl an Komplikationen aufgefunden.

- a) In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass bei der Anwendung von SSRI (serotonin specific reuptake inhibitors)-Antidepressiva in der psychopharmakologischen Therapie in einigen Fällen ernsthafte Blutungs-Komplikationen als Nebenwirkung bekannt geworden sind (Goldberg, Arch. Fam. Med. 7: 78-84, 1998). Diese Nebenwirkung kann auf die behandlungsbedingt erniedrigten Serotonin-Spiegel in Blutplättchen zurückgeführt werden (Bottlander et al., Fortschr. Neurol. Psychiatr. 66: 32-35, 1998). Diesem Anwendungsfeld zuzuordnen sind die neuen Erkenntnisse in der Beteiligung von Serotonin an der primären Hämostase. Eine Nebenwirkung von Antidepressiva, die blockierend auf den Serotonin-Transporter wirken, ist das Auftreten akuter Blutungsepisoden, offensichtlich wegen unzureichender Serotonin-Speicherung in den Thrombozyten der behandelten

Patienten. Der Serotonin-Transporter der Thrombozyten ist nämlich identisch mit dem eigentlichen Ziel der Antidepressiva, dem Serotonin-Transporter des ZNS. Beim Auftreten solcher Blutungsepisoden werden die Antidepressiva in der Regel abgesetzt, mit der Folge, daß sich das Befinden des betroffenen Patienten verschlechtert und das Depressions-bedingte Selbstmord-Risiko steigt. Dazu muß es nicht kommen, wenn in einer solchen akuten Blutungsepisode handelsüblicher von Willebrand-Faktor (vWF) infundiert wird.

b) Erhöhte Serotonin-Konzentrationen während der Präeklampsie korrelieren mit den Zunahmen der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Subpopulationen. Mit spezifischen Inhibitoren der peripheren TPH-Isoform wird eine frühzeitige Behandlung der drohenden Präeklampsie ermöglicht, die weder einen Einfluß auf die Serotonin-Biosynthese im mütterlichen, noch im fötalen Gehirn ausübt.

c) Neben diesen Anwendungen wird auch ein positiver Einfluß von nur peripher wirkenden Inhibitoren auf die Transplantationsmedizin erreichbar. Eine wesentliche Einschränkung der herkömmlichen immunsuppressiven Therapie ist nämlich durch die nephro-, hepato- und neurotoxischen Nebenwirkungen der meistverwendeten Substanz, Cyclosporin A (CsA), gegeben. Neuere Immunsuppressiva natürlichen Ursprungs, wie FK506 und Rapamycin, ermöglichen daher in Kombinationspräparaten mit CsA eine effektivere (additive) immunsuppressive Behandlung mit erniedrigten Nebenwirkungen, da CsA dadurch niedrige dosiert zur Anwendung kommt.

Die immunsuppressive Wirkung erniedriger Serotonin-Spiegel im Blut kann dazu genutzt werden, die toxischen Substanzen, CsA, FK506 und Rapamycin niedriger dosiert zum Einsatz zu bringen.

Die Beeinflussung der nTPH- und/oder TPH-Regulation kann gemäß der Erfindung auf folgenden Wegen erfolgen:

Die spezifische Herunterregulierung der nTPH und/oder pTPH erfolgt molekularbiologisch mit Ribozymen, Antisense-Oligonucleotiden oder durch Antisense-RNA-Expression, wobei die Sequenzunterschiede der Isoform-mRNAs die Beeinflussung jeweils nur einer mRNA erlauben. Außerdem wird gemäß der Erfindung auch mit pharmakologischen Ansätzen mit Hilfe spezifischer TPH-Inhibitoren, wie z. B. p-Chlorophenylalanin oder p-Ethyl-phenylalanin, gearbeitet.

Die Serotonin-Produktion wird molekularbiologisch bevorzugt durch gewebsspezifische Überexpression der TPH-Isoformen stimuliert, pharmakologisch können beispielsweise die Vorgänger-Substanz, 5-Hydroxytryptophan, oder aber auch substituierte Analoga verabreicht werden, nicht zuletzt aber auch Serotonin selbst.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen ist dadurch gekennzeichnet, daß eine spezifische Inhibierung der peripheren Serotoninbiosynthese durchgeführt wird, nachfolgend die aus dem ZNS stammenden Metabolitenkonzentrationen bestimmt werden und anhand einer Vergleichskurve der Krankheitsgrad ermittelt wird. Dazu ist es notwendig, Substanzen einzusetzen, die nicht Blut-Hirn-Schrankengängig sind.

Gegenstand der Erfahrung ist auch die neu gefundene neuronale Tryptophan-Hydroxylase (nTPH), die sich von der bisher bekannten TPH in der regulatorischen Domäne unterscheidet (die katalytische Domäne ist identisch). nTPH hat die in Abb. 9 angegebene Aminosäuresequenz.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele(Abbildungen) näher erläutert werden.

Abbildung 1. Erstellung der TPH(-/-)-Mäuse

- A. Schematische Darstellung des Targeting-Verfahrens. Die ersten vier der 11 Exone des TPH-Gens sind angegeben. Das Knockout-Konstrukt wurde durch homologe Rekombination in ein Allel von ES-Zellen integriert, wodurch das erste kodierende Exon des TPH-Gens inaktiviert wurde. Außerdem enthält die integrierte Neomycin-Resistenzkassette eine Transkriptions-Stop-Sequenz. Die Positionen der analytischen Amplikons für Wild-Typ- und Knockout-Identifizierung sind angegeben, sowie die Positionen der internen und der externen Southernblot-Sonden. Die Eco RI-Stellen, die die Identifizierung von Wild-Typ- und Knockout-Tieren in Southernblots ermöglichen sind fett hervorgehoben (RI). Restriktionsstellen: RI: Eco RI; Hd: Hind III; Bm: Bam HI; Sc: Sac I.
- B. Agarosegel-Elektrophorese analytischer PCR-Produkte. Wie in A angegeben, wird für das Wild-Typ-Allel ein 1.1 kb-Fragment, für das Knockout-Allel ein 1.3 kb-Fragment erhalten.
- C. Southernblot-Untersuchung Eco RI-verdauter genomicscher DNA. Wie in A angegeben, detektieren beide Sonden ein 10 kb-Fragment für das Wild-Typ-Allel und ein 8 kb-Fragment für das Knockout-Allel.

Abbildung 2. Quantifizierung von Tryptophan (Trp) und Serotonin (5-HT) in peripheren Geweben und von Trp, 5-HT und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) in ausgesuchten Gehirnarealen

- A. Trp und 5-HT in Vollblut- und in Duodenum-Proben von 129SvJ-, C57BL/6-, TPH(-/-)-, und TPH(+/+)-Mäusen. N.d.: nicht detektierbar (< 25 fg/μl). \*: statistisch gegenüber allen anderen Maus-Linien signifikant ( $p < 0.05$ ).

- B. Trp, 5-HT und 5-HIAA in Hippocampus- und Frontalkortex-Proben von 129SvJ-, C57BL/6-, TPH(-/-)-, und TPH(+/+)-Mäusen. \*: statistisch gegenüber allen anderen Maus-Linien signifikant ( $p < 0.05$ ). 5-HT ist im Hippocampus von TPH(-/-)-Mäusen zwar gegenüber TPH(+/+)-Mäusen signifikant erniedrigt, nicht jedoch gegenüber den anderen Labormaus-Linien.

Abbildung 3. Gestörte primäre Hämostase in TPH(-/-)-Mäusen

- A. Verlängerte Blutungszeiten von TPH(-/-)-Tieren. Normale Blutungszeiten von Kontroll-Tieren liegen bei 8 – 11 min, wohingegen TPH(-/-)-Mäuse im Mittel 35 min lang bluten.
- B. Heilung des Phänotyps durch intrakardiale 5-HT-Injektion. Die applizierten 5-HT-Mengen führen zu 1/10 und dem 10-fachen der normalen Blutkonzentrationen.
- C. Heilung des Phänotyps durch intrakardiale von Willebrandt-Faktor-Injektion. Der Effekt ist spezifisch für die TPH(-/-)-Mäuse, wohingegen Kontrolltiere nicht beeinflusst werden.

Abbildung 4. Gestörte T-Zell-vermittelte Immunantworten in TPH(-/-)-Mäusen

- A. Zeitverlauf der Netto-Ohrenschwellung nach Oxazolon-Behandlung, indikativ für T-Zell-vermittelte Hypersensitivität des Spät-Typs. TPH(-/-)-Mäuse zeigen keine allergische Schwellungsreaktion.
- B. Bestimmung von Leukocyten-Subpopulationen im peripheren Blut von TPH(-/-)-Tieren mit Hilfe der Fluß-Cytometrie. Nur CD4+-T-Zellen (CD4+/CD3+) sind signifikant vermindert ( $p < 0.05$ ), nicht aber CD8+-T-Zellen.
- C. Exemplarische Ansicht der Abstoßung von Haut-Zweittransplantaten. Pfeilspitzen kennzeichnen die sensibilisierenden Ersttransplantate, Pfeile die Zweittransplantate. Gegenüber den gut einheilenden Transplantaten an TPH(-/-)-Tieren fallen die Transplantate an TPH(+/+)- und C57BL/6-Tieren zum selben Zeitpunkt nach der Transplantation durch mangelnde Revaskularisierung und Entzündungen an den Wundrändern auf (weiße Abstoßung), oder sind bereits vollständig abgestoßen worden (Ersttransplantat und zwei der Zweittransplantate am C57BL/6-Tier).

Abbildung 5. Komplexität der TPH-Expression in der Maus

- A. Sequenzvergleich der publizierten cDNA (Stoll et al., 1990), der klonierten alternativ gesplittenen cDNA mit einer 34 bp-Verlängerung von Exon 3, und genomicscher DNA. Chromosomale DNA weist die 34 bp-Verlängerung unmittelbar nach der Splicing-Donor-Stelle von Exon 3 auf, wonach ein obligatorisches GT-Dinucleotid folgt; das verlängerte Exon 3 wird im Folgenden Exon 3b genannt.
- B. RNase Protection Assays von 80 µg total-RNA der angegebenen Organe und 10 µg der Mastocytoma-Zellen P815 (2x) mit der in 5A beschriebenen cDNA. Die Sonde identifiziert nun eindeutig sechs verschiedene Splice-Varianten der Maus-TPH-mRNA.

Dabei fällt auf, daß nur noch ein Set von drei Varianten in den TPH-KO-Mäusen exprimiert wird. Die schwache Bande auf Höhe der bekannten TPH-mRNA, die in Duodenum und Lunge der TPH-KO(-/-)-Tiere zu sehen ist, beruht auf einer hohen Sequenzhomologie der Varianten. Die P815-RNAs zeigen, wie vergleichsweise niedrig die Expression von TPH in Geweben ist, fast am Rande der Detektionsgrenze.

- C. Alternatives Splicing zwischen Exon 3 und Exon 4. Die beteiligten Splicing-Donor-(SDS) und Splicing-Acceptor-Stellen (SAS) sind angegeben. Die Sequenzabschnitte der publizierten Sequenz sind als Exon 3a und Exon 4a gekennzeichnet. Durch das Splicing von SDS2 auf SAS1 kommen die C-Varianten zustande, die nur für die regulatorischen Domäne der TPH-Isoformen kodieren (vgl. Abb. 7B). Das Splicing von SDS2 auf die interne SAS2 von Exon 4 hebt den Leserasterschub auf, der durch die zusätzlichen 34 bp von Exon 3b zustande kommen würde. Die konstanten Abschnitte sind hellgrau unterlegt, die alternativen Abschnitte dunkelgrau. Außerdem sind die alternativen Abschnitte, sowie flankierende Intron-Sequenzen kursiv angegeben.

#### Abbildung 6. Charakterisierung des neuen Exons 2b

- A. Genomische Sequenz von Exon 2b der Maus mit flankierenden Sequenzen. Der ORF ist in der Trinukleotid-Schreibweise fett hervorgehoben. Im 5'-flankierenden Bereich wird ein Teil des putativen, neuen Promoters gezeigt, worin eine TATA-Box und der wahrscheinlichste Transkriptionsstartpunkt (+1) markiert sind. Im 3'-flankierenden Bereich ist die Splicing-Donorstelle von Exon 2b dargestellt. Intron-Sequenzen wurden in Kleinbuchstaben kursiv hervorgehoben, wobei das kurze Intron von 53 bp symbolisch durch eine Linie von den Abschnitten des ORFs überbrückt wurde. Zur Übersichtlichkeit wurden unter die beteiligten Splicing-Donorstellen, -Branchingstelle und -Akzeptorstelle die jeweiligen Konsensus-Sequenzen angegeben.
- B. Untersuchung der Exon-Intron-Struktur des neuen Exons 2. Fünf von acht Nucleotiden stimmen in der Maus mit der Konsensus-Sequenz von Splicing-Donorstellen überein (fett und unterstrichen), vier in der Ratte und drei im Menschen. Das Intron zwischen dem neuen Exon 2 und Exon 3 ist in der Maus genau 948 bp lang, ähnlich wie in der Ratte und im Menschen.

#### Abbildung 7. Schematische Darstellung der TPH-Genstruktur

- A. Schematische Gegenüberstellung der bekannten Splicing-Struktur (oben) mit der Struktur, die in der vorliegenden Arbeit für den Genabschnitt der regulatorischen Domäne erhalten wurde (unten). Die Promotor-Position, für die es experimentelle Evidenz gibt, wurde mit P2 gekennzeichnet.
- B. Zusammenstellung aller neu entdeckten mRNA-Varianten. Der Promotor 1 ist überwiegend in der Peripherie aktiv, während der neue Promotor 2 für die Expression im

CNS zuständig ist. Die als Variante A bezeichnete mRNA ist die bekannte Form der TPH-mRNA. Die Variante A' wurde bereits kloniert, und kodiert für eine aktive TPH-Isoform. Die Varianten B und B' sind zwar noch nicht kloniert, aber mit Hilfe von RPA-Versuchen mehrfach eindeutig nachgewiesen worden. Die Varianten C und C' führen zur Expression nur der regulatorischen Domänen. Zur Vereinfachung sind die mRNAs nur bis zum 6. Exon der insgesamt 11 Exone dargestellt.

Abbildung 8. Aminosäure-Sequenzvergleich der neuen regulatorischen Domäne von TPH mit anderen AAAHs

Der obere Teil der Sequenzen zeigt den neuen Abschnitt von TPH. Unten sind die konservierten Sequenzabschnitte der regulatorischen Domänen der AAAHs angegeben. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des ClustalW-Programms einzeln miteinander verglichen, und dann von Hand zusammengestellt. Dabei wurden teilweise größere Lücken erlaubt, um die übereinstimmenden Strukturelemente herauszustellen. Auffällige Sequenzmotive sind eingerahmt und einzeln benannt. Vier der fünf Motive stimmen mit Elementen der Sekundärstruktur von PAH überein. Teilweise mit dem IEDN-Motiv überlappend ist ein Bereich der regulatorischen Domäne eingerahmt und grau unterlegt, der in die Furche des katalytischen Zentrums hinein reicht, wie aus kristallographischen Untersuchungen der PAH bekannt ist. Weitere Erläuterungen im Text. Die verwendeten Sequenzen sind: nstph = Neuronen-spezifische TPH (die neue Variante) der Maus, musth = TH der Maus, muspah und humpah = murine und humane PAH, ptph = peripherie TPH der Maus (bekannte Variante).

Abbildung 9. Aminosäure-Sequenz der nTPH

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Beeinflussung des Serotoninspiegels durch spezifische Regulierung der TPH- und/oder der nTPH-Aktivität.
2. Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Beeinflussung der TPH- und/oder der nTPH-Regulation erhöht oder erniedrigt wird.
3. Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine spezifische Inhibierung der peripheren Serotoninbiosynthese durchgeführt wird, nachfolgend die aus dem ZNS stammenden Metabolitenkonzentrationen bestimmt werden und anhand einer Vergleichskurve der Krankheitsgrad ermittelt wird.
4. Verfahren zur Behandlung der defizienten primären Hämostase nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Beeinflussung der TPH-Regulation erhöht wird.
5. Verfahren zur Behandlung der defizienten primären Hämostase nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion erhöht oder daß Serotonin verabreicht wird.
6. Verfahren zur Behandlung der defizienten primären Hämostase nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch gewebsspezifische Überexpression erhöht wird.
7. Verfahren zur Behandlung der defizienten primären Hämostase nach Anspruch 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Zugabe der Vorgängersubstanz 5-Hydroxytryptophan erhöht wird.
8. Verfahren zur Behandlung der defizienten primären Hämostase nach Anspruch 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Zugabe von substituierten Analoga von 5-Hydroxytryptophan erhöht wird.
9. Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion erniedrigt wird.
10. Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Ribozyme erniedrigt wird.

11. Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Antisense-Oligonukleotide erniedrigt wird.
12. Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion durch Antisense-RNA-Expression erniedrigt wird.
13. Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Serotoninproduktion mit Hilfe spezifischer TPH-Inhibitoren wie p-Chlorophenylalanin oder p-Ethynylphenylalanin erniedrigt wird.
14. Verfahren zur Behandlung in Diabetes Mellitus auftretender Arteriosklerose/Thrombose nach Ansprüchen 9, 10, 11, 12 und 13.
15. Verfahren zur Behandlung von Überreaktionen oder unerwünschter normaler Reaktionen des Immunsystems (z.B. Allergien, Immun-, sowie Autoimmun-Erkrankungen, Risiko-Schwangerschaften wie Präeklampsie, sowie in der Transplantationsmedizin zur immunsuppressiven Therapie), dadurch gekennzeichnet, dass die Serotoninproduktion erniedrigt wird.
16. Präparat zur Behandlung der Praeklampsie nach Anspruch 15, enthaltend Inhibitoren (Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide, Antisense-RNA-Expression, p- Chlorophenylalanin oder p-Ethynylphenylalanin), mit denen die Serotoninproduktion erniedrigt wird.
17. Präparat zur Behandlung von Allergien nach Anspruch 15, enthaltend Inhibitoren (Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide, Antisense-RNA-Expression, p- Chlorophenylalanin oder p-Ethynylphenylalanin), mit denen die Serotoninproduktion erniedrigt wird.
18. Präparat zur Behandlung von Immun-, sowie Autoimmun-Erkrankungen nach Anspruch 15, enthaltend Inhibitoren (z.B.: Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide, Antisense-RNA-Expression, p- Chlorophenylalanin oder p-Ethynylphenylalanin), mit denen die Serotoninproduktion erniedrigt wird.
19. Kombinationspräparat zur Behandlung von Blutungsepisoden in der psychopharmakologischen Behandlung von Depressionen mit Antidepressiva, die auf den

Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter wirken, enthaltend Antidepressiva und von Willebrand-Faktor.

20. Kombinationspräparat zur immunsuppressiven Therapie bei Transplantationen, enthaltend gängige Immunsuppressiva (z.B.: CsA, FK506 oder Rapamycin) und Inhibitoren (z.B.: Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide, Antisense-RNA-Expression, p- Chlorophenylalanin oder p-Ethynylphenylalanin), mit denen die Serotoninproduktion erniedrigt wird.

21. Sequenz der neuronalen TPH, wie in Abb. 9 angegeben.

22. DNA-Konstrukt für die Erzeugung peripher Serotonin-defizienter Tiere, wie in Abb. 1 dargestellt.

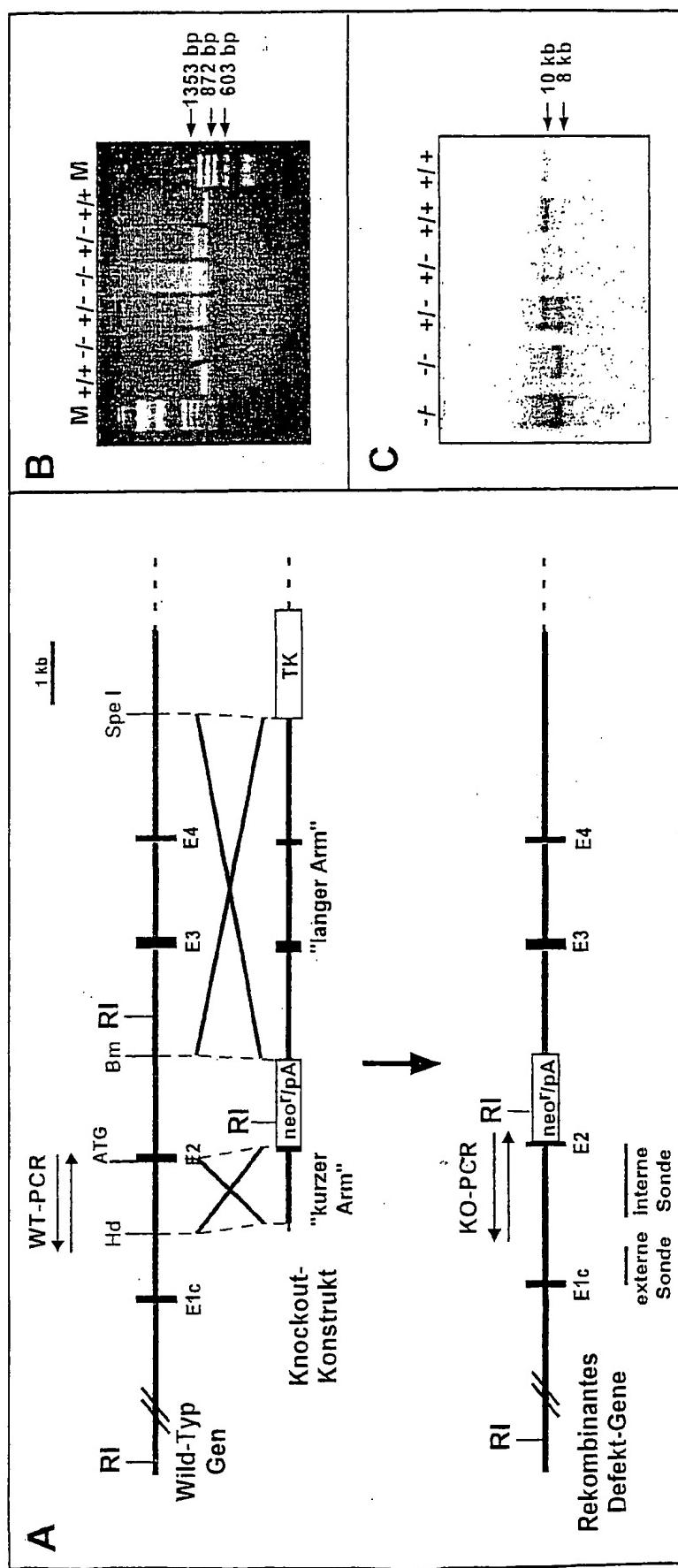


Abb. 1

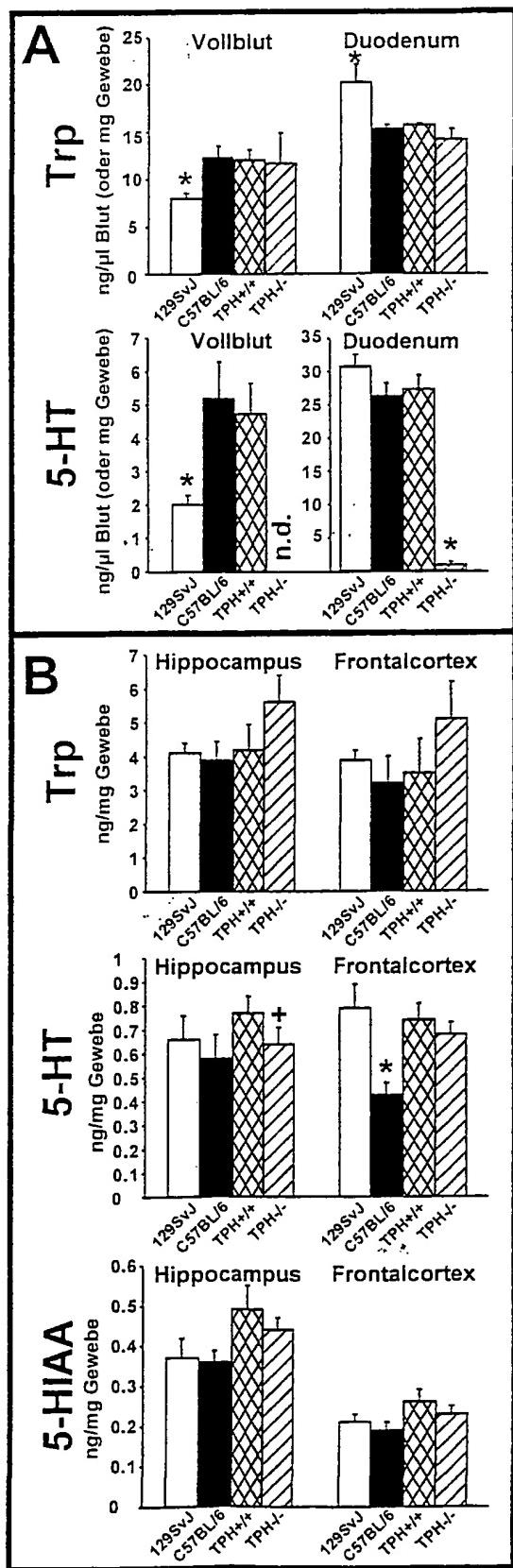


Abb. 2

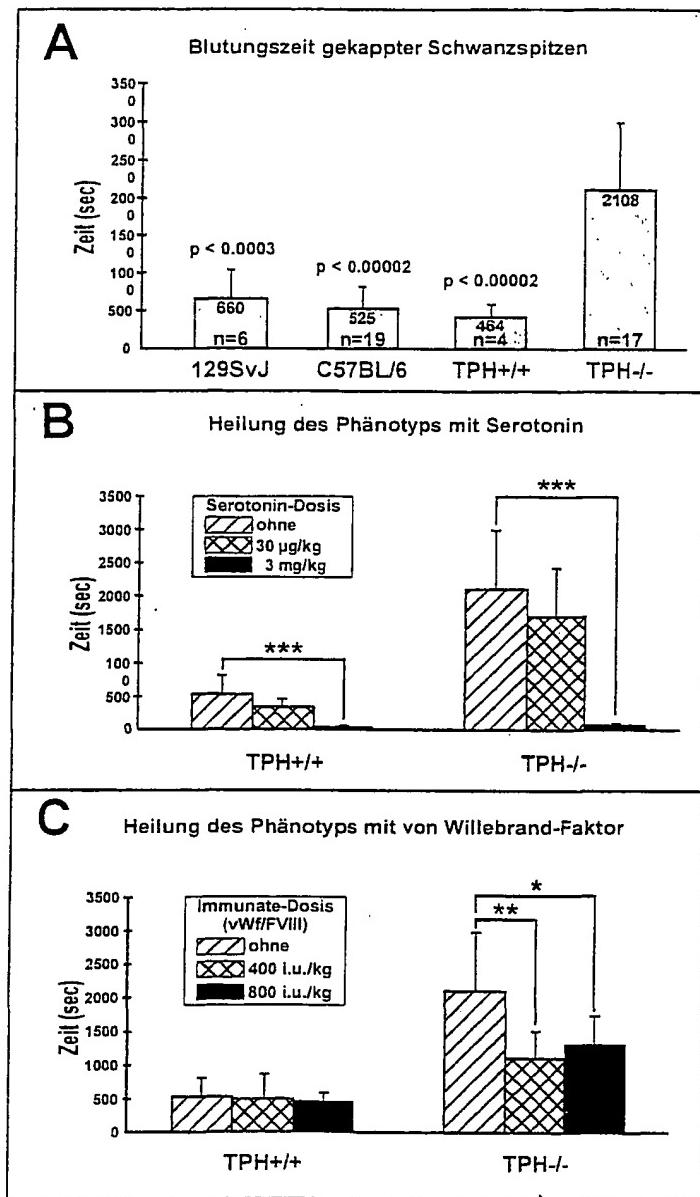
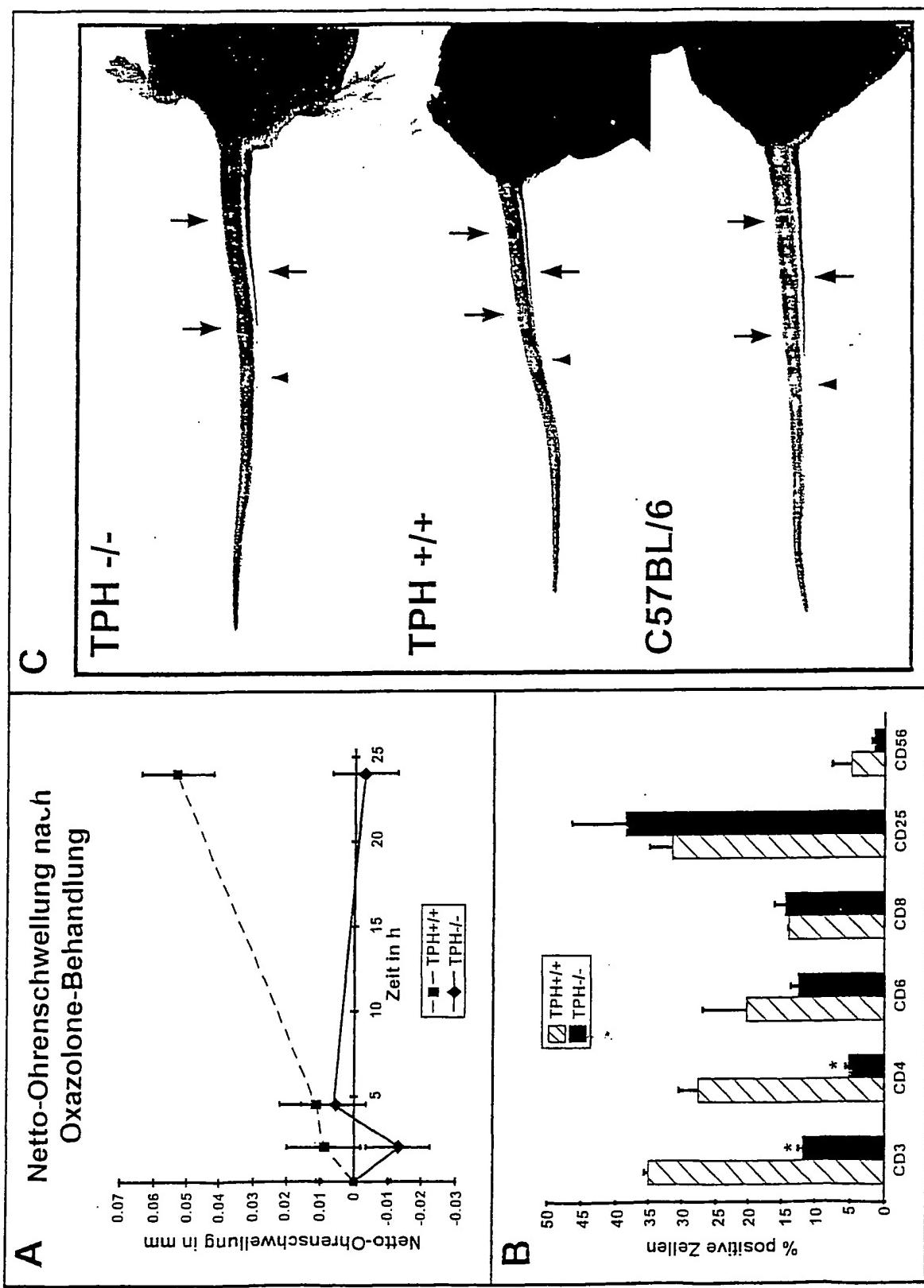


Abb. 3

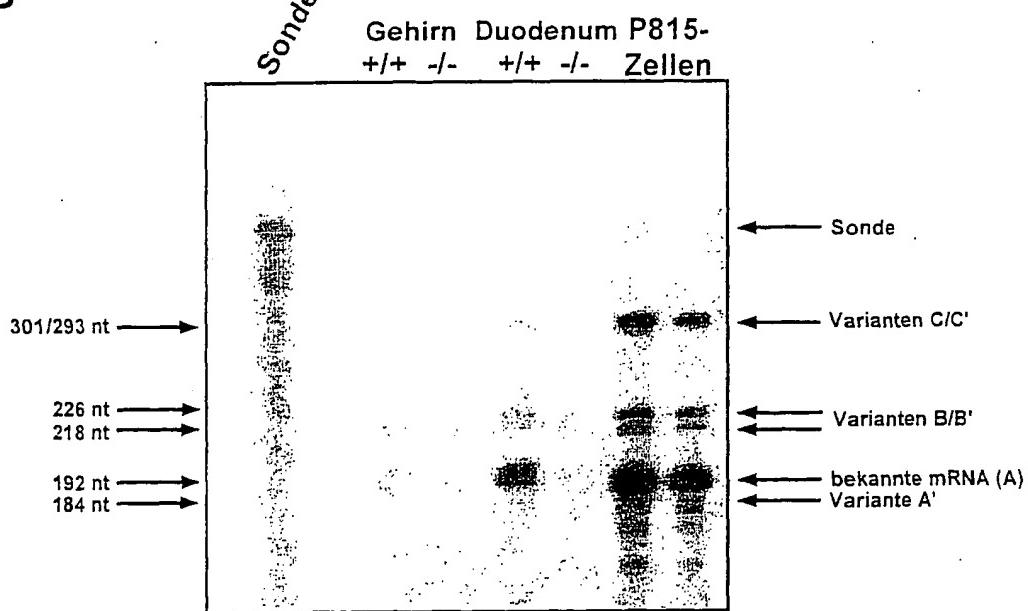


A

34 bp-Verlängerung in  
ca. 40 % der Klone  
stammt aus Intron 3

<b>Exon 3</b> publizierte Sequenz <b>AGGAAGACG</b> cDNA mit der 34 bp- Verlängerung von Exon 3 <b>AGGAAGACG</b>	<b>Exon 4</b> <b>TTATGG AGACTGTCCC</b> <b>GTACGTGTGA GACGGCAAG CCCCCACCTCG CAGATTATGG AGACTGTCCC</b>
Sequenz der Exon-Intron- e auf genomischer Ebene <b>AGGAAGACG GTACGTGTGA GACGGCAAG CCCCCACCTCG CAGATTATGG AGACTGTCCC</b>	
<b>neues Exon 3 (Ex3b)</b>	<b>neues Intron 3</b>

B



C

Exon 3

The diagram illustrates the 5' Untranslated Region (UTR) of the human c-fos gene. It shows two alternative splicing pathways originating from Exon 3:

- Pathway a:** Splicing to Exon 4 through site SDS1.
- Pathway b:** Splicing to Exon 4 through sites SDS1 and SDS2. A dashed arrow indicates a 34 bp insertion between SDS1 and SDS2, which is approximately 40% of the original length and originates from Intron 3.

The 5' UTR sequence is as follows:

```

    .... GCTCACTGCG AAGGAAGACG | GTACCGTGTGA GACGCCAAGT CCCCCACCTCG CAGAGTAAGC ACCCGATGIG ....
    SDS1          34 bp-Verlängerung in
                  ca. 40 % der Länge
                  stammt aus Intron 3
    SDS2
  
```

Below the 5' UTR, the 3' UTR sequence is shown:

```

    .... ACACGTTAGG AGACGTCGG TTGGTTTCCG TAAAGAATTT CTGACGAGG CTCTGGGCC AACAGATGCG TGTTG ...
  
```

The 3' UTR is divided into two regions labeled 'a' and 'b' corresponding to the two alternative splicing pathways.

Abb. 5

**A**

.....ACACCACACGGCTGGGCAGGTTCTAGATTGTGTACACACAAAT  
 SP1  
 <CCAAT>  
 CCTTTATTAGCTAGGTGGTCATTGGGGAGTGAATGTCTCTGCATGTCTCAAT  
 CTF/NF-Y

AAAATACGAGAGAACCCCTGCCTCCCTCAGGCCATTAGGAATTGATAGTTAAC  
 NF-1

TGTTTGAAGTGCTTGAGGTTGTACAAAGTAAACAGTCAATAAATGTTGACTAT  
 TFII-D  
 TATA-Box

+1 ?  
 CGTTATCAAGCGAGTTGTGCTTCCC ATG ACA G gttatttagtcattca  
 A G gtaagt-Konsensus

*53 bp-Intron*

aagaataaacatttgaatgtggacaccatcctcgaag GA CCC GAG ACT  
 YNYRAY-Konsensus Y<sub>n</sub>cag G-Konsensus

**RT-PCR-Primer**

AGG GCT CCT GCC ACA TGG CAG AGC CTT AGC CAA CTT CCT TTC

AAC CTG TTT CTC TCC CTG ACT TCC TTG gtgaggagttataaaac  
 AG gtaagt-Konsensus

**B**

## Exon 2b

## Intron

AGgt aagt-Konsensus:	genomische Sequenz
...TCCCTGA CTTCTT <u>Ggt</u> gaggagttat aa...	Maus
...AGCCTTA ACCTCCT <u>Ggt</u> ctcaagtgac cc...	Mensch
...TCCCTGA CCTCTTT <u>Ggt</u> gaggagttat aa...	Ratte
...SerLeuT hrSerLeu	Proteinsequenz
...SerLeuA snLeuLeu	Maus und Ratte
	Mensch

*Abb. 6*

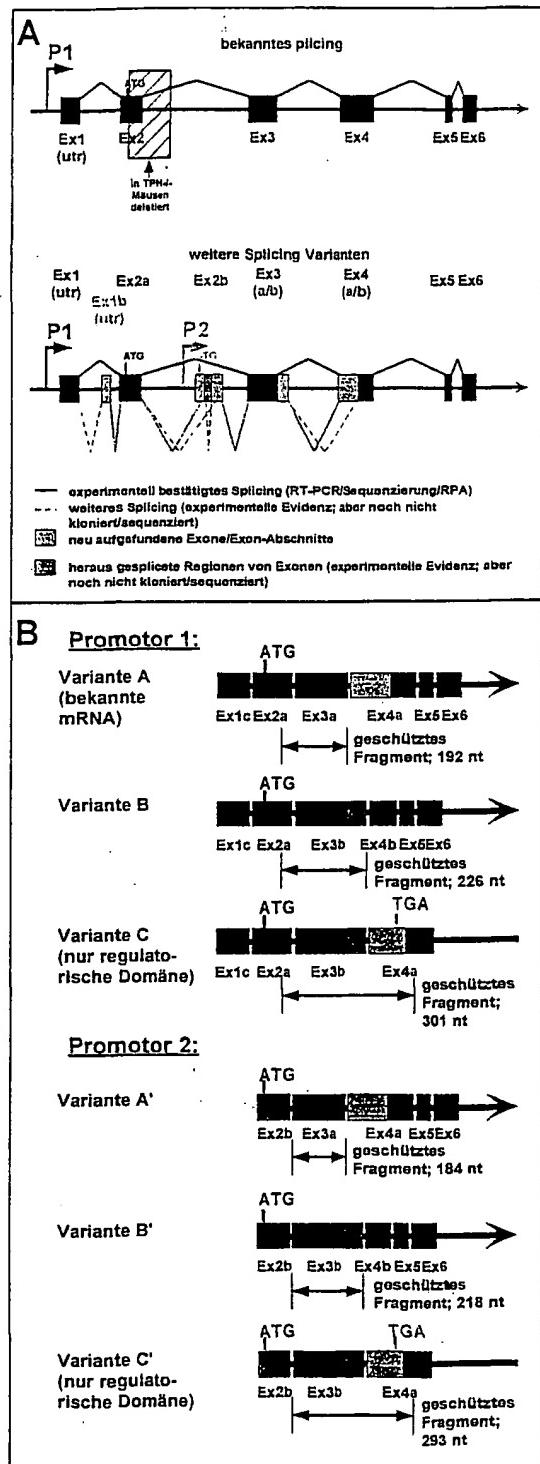


Abb. 7

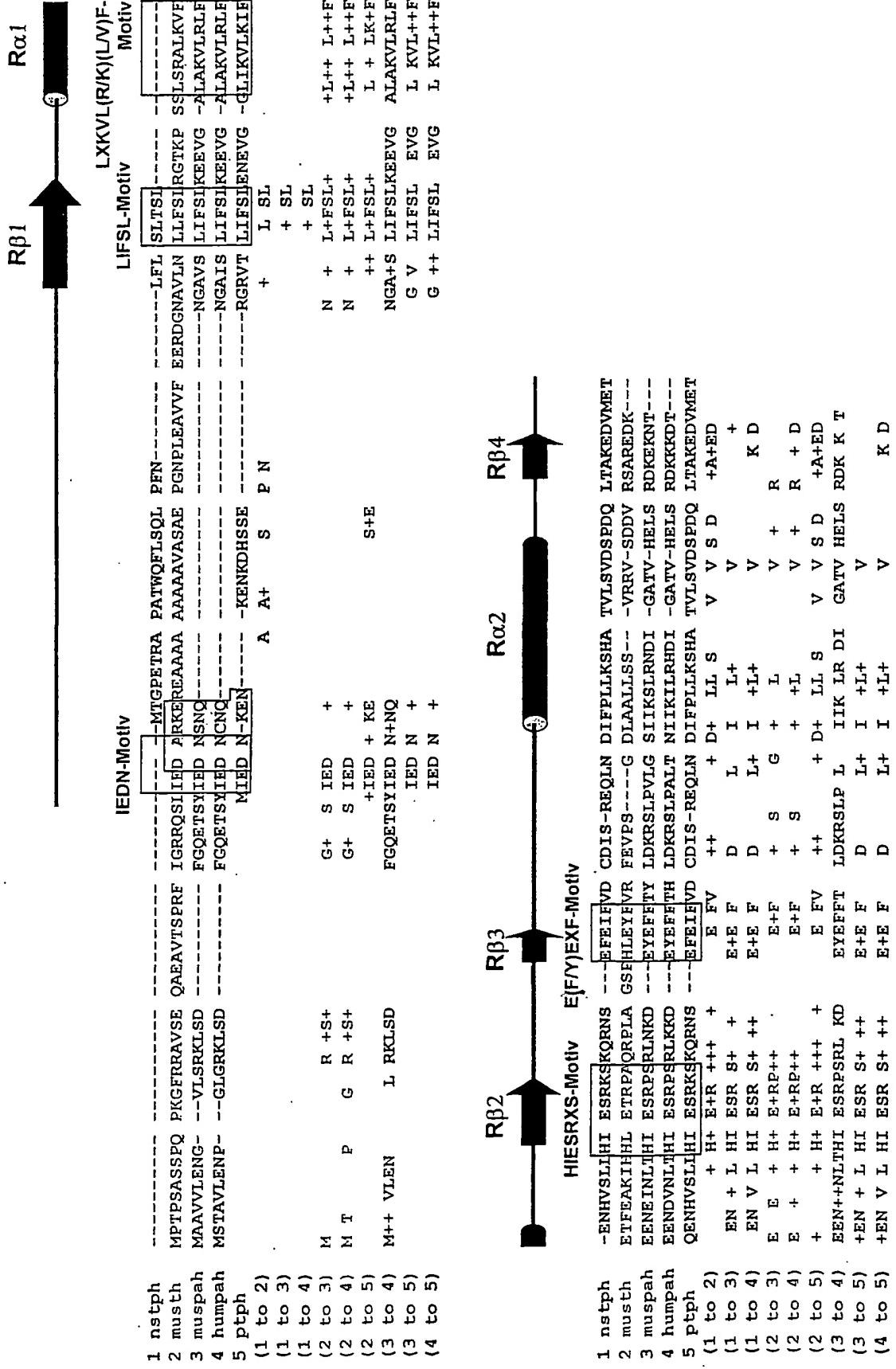


Abb. 8

1 MTGPETRAPA TWQSQLSQLPF NIFLSQLTSLE NHVSLHIES RKSQQRNSEF  
51 EIFVDCDISR EQLNDFPILL KSHATVVLSDV SPDQLTAKED VMETVWPWFPK  
101 KISDLDFCAN RVLLYGSLLD ADHPGEFKDNV YRRRKYFAE LAMNYKHGDP  
151 IPKIEFTEE IKTWGTFIRE LNKLKYPTAAC REYLRNLLPL SKYCCGYREDN  
201 IPQLEDVSNF LKERTGFSIR PVAGYILSPRD FLSGLAFRVE HCTQYVRHSS  
251 DPLYTPEPDT CHELLGHVPL LAEPSEAQFS QEIGGLASLGA SEETVQKLAT  
301 CYFFTVEFGL CKQDGQLRVF GAGLLSSIIE LKHALSGHAK VKPFDPKIAC  
351 KQECLITSFQ DVYFVSESFQ DAKEKMREFA KTVKRPFGLK YNPYTQSVQV  
401 LRDTKSITSA MNELRYDLDV ISDALARVTR WPSV

*This Page Blank (uspto)*

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 02/017891 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 31/405,  
A61P 37/00, A61K 45/06

[DE/DE]; Florastrasse 2, 13187 Berlin (DE). **BADER,**  
Michael [DE/DE]; Strasse 45, Nr. 35, 13125 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03178 (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Str. 10,  
13125 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldeatum:  
27. August 2001 (27.08.2001) (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 43 124.0 31. August 2000 (31.08.2000) DE

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-  
LARE MEDIZIN [DE/DE]; Molekulare Medizin, Robert-  
Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 17. Oktober 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WALTHER, Diego

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING NEURONAL DISEASES AND FOR TREATING PRIMARY HEMOSTASIS DEFICIENCY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIK VON NEURONALEN ERKRANKUNGEN SOWIE ZUR BEHANDLUNG DER DEFIZIENTEN PRIMÄREN HÄMOSTASE

(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosing neuronal diseases and for treating primary hemostasis deficiency. The invention further relates to a method for suppressing the immune system, which is inter alia significant for transplantation medicine and for the treatment of allergies. The invention is used in the field of medicine and in the pharmaceutical industry. The invention is worked according to the claims. The invention is based on the discovery that serotonin is synthesized by TPH isoforms that are differently expressed in the neurons in the peripheral tissues. Gentargeting was used to show that an isoform, the peripheral enzyme (referred to in the following as TPH), is responsible for maintaining primary hemostasis and T-cell mediated immune responses. Another isoform, the newly identified neuron-specific TPH (referred to as nTPH) synthesizes serotonin irrespective thereof in the central nervous system. The invention further relates to the newly identified neuronal tryptophane hydroxylase (nTPH) that differs from the TPH known so far in the regulatory domain.

A3

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Suppression des Immunsystems, was u.a. für die Transplantationsmedizin und für die Behandlung von Allergien von Bedeutung ist. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Der Erfindung liegt die wesentliche Entdeckung zugrunde, dass Serotonin im Körper durch unterschiedlich exprimierte TPH-Isoenzyme in den Neuronen und in peripheren Geweben synthetisiert wird. Es wurde durch Gentargeting gezeigt, dass eine Isoform, das peripheres Enzym (weiterhin TPH genannt) für die Aufrechterhaltung der primären Hämostase und der T-Zell-vermittelten Immunantworten verantwortlich ist. Eine weitere Isoform, das neu identifizierte neuronenspezifische TPH (als nTPH bezeichnet) synthetisiert Serotonin unabhängig davon im ZNS. Gegenstand der Erfindung ist auch die neu gefundene neuronale Tryptophan-Hydroxylase (nTPH), die sich von der bisher bekannten TPH in der regulatorischen Domäne unterscheidet.

WO 02/017891

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 A61K31/405 A61P37/00 A61K45/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, PHARMAPROJECTS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 105 192 A (COUGHLIN SHAUN R) 23 March 1983 (1983-03-23) *siehe Zusammenfassung, Seite 1, Zeilen 43-51, 61-65, Seite 2, Zeilen 1-10, sowie Zeilen 61-65 mit Seite 3, Zeilen 1-6*	1
X	US 3 686 414 A (KOE BILLIE KENNETH) 22 August 1972 (1972-08-22) *siehe Spalte 1, Zeilen 7-15 und Zeilen 44-56, Spalte 2, Zeilen 45-68*	1
X	US 4 994 475 A (GITTOES MAURICE W) 19 February 1991 (1991-02-19) *siehe Zusammenfassung, Spalte 2, Zeilen 32-66, Spalte 3, Zeilen 39-58*	1

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 February 2002	01 April 2002 (01.04.02)
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Stoltner, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE01/03178

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: 1 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1

## Remark on Protest


The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

## 1. Claim No. 1:

Method for influencing serotonin levels by specifically regulating TPH and/or nTPH activity.

## 2. Claims Nos.: 2-8

Method for diagnosing neuronal diseases and for treating deficient primary hemostasis by influencing the serotonin production via the regulation of TPH and/or nTPH.

## 3. Claims Nos.: 9-14

Method for treating arteriosclerosis/thrombosis by reducing serotonin levels.

## 4. Claims Nos.: 15-18

Method for treating overreactions of the immune system due to a reduced serotonin level, as well as pharmaceutical preparations therefor.

## 5. Claim No.: 19

Combination preparation for use in the treatment of hemorrhagic episodes.

## 6. Claim No.: 20

Combination preparation for use in immunosuppressive therapy.

## 7. Claims Nos.: 21-22

DNA sequences of neuronal TPH and for generating serotonin-deficient animals.

## FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 1

Present patent claim 1 relates to a disproportionately large number of possible methods. In the present case, the patent claim relates to such a large number of possible options, variables, possible permutations and/or restrictions that it lacks clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT to such an extent, that a meaningful search seems impossible. For this reason, the search was restricted to that part of the claim that seemed to be supported (and/or concise), according to the above mentioned terms, i.e. the use of tryptophane hydroxylase inhibitors of any kind for reducing the serotonin activity/the serotonin level.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International App. No.  
PCT/DE 01/03178

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB 2105192	A 23-03-1983	AU	8770282 A	03-03-1983
		BE	894228 A1	16-12-1982
		DE	3232031 A1	05-05-1983
		FR	2511869 A1	04-03-1983
		IT	1153185 B	14-01-1987
		JP	58065224 A	18-04-1983
		US	4444778 A	24-04-1984
US 3686414	A 22-08-1972	NONE		
US 4994475	A 19-02-1991	AU	588365 B2	14-09-1989
		AU	6260186 A	12-03-1987
		CA	1273879 A1	11-09-1990
		DE	3650733 D1	25-11-1999
		DE	3650733 T2	04-05-2000
		DE	3686622 D1	08-10-1992
		DE	3686622 T2	01-04-1993
		DK	433786 A	12-03-1987
		EP	0216555 A2	01-04-1987
		EP	0452765 A2	23-10-1991
		GB	2181346 A ,B	23-04-1987
		JP	1942184 C	23-06-1995
		JP	6067839 B	31-08-1994
		JP	62061919 A	18-03-1987
		US	4835151 A	30-05-1989
		US	4918084 A	17-04-1990
		US	4738973 A	19-04-1988

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03178

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 A61K31/405 A61P37/00 A61K45/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, PHARMAPROJECTS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB 2 105 192 A (COUGHLIN SHAUN R) 23. März 1983 (1983-03-23) *siehe Zusammenfassung, Seite 1, Zeilen 43-51, 61-65, Seite 2, Zeilen 1-10, sowie Zeilen 61-65 mit Seite 3, Zeilen 1-6*	1
X	US 3 686 414 A (KOE BILLIE KENNETH) 22. August 1972 (1972-08-22) *siehe Spalte 1, Zeilen 7-15 und Zeilen 44-56, Spalte 2, Zeilen 45-68*	1
X	US 4 994 475 A (GITTO'S MAURICE W) 19. Februar 1991 (1991-02-19) *siehe Zusammenfassung, Spalte 2, Zeilen 32-66, Spalte 3, Zeilen 39-58*	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie anggegeben ist
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besondaren Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung oder andere Maßnahmen bezieht	
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. Februar 2002	01 April 2002 (01.04.02)

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Stoltner, A
---	--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 01/03178

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 1 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Anspruch : 1 Verfahren zur Beeinflussung des Serotoninspiegels durch spezifische Regulierung der TPH-und/oder nTPH-Aktivität</p> <p>2. Ansprüche: 2-8 Verfahren zur Diagnostik von neuronalen Erkrankungen sowie zur Behandlung der defizienten primären Hämostase durch Beeinflussung der Serotoninproduktion über die Regulierung von TPH- und/oder nTPH</p> <p>3. Ansprüche: 9-14 Verfahren zur Behandlung von Arteriosklerose/Thrombose durch Erniedrigung des Serotoninspiegels</p> <p>4. Ansprüche: 15-18 Verfahren zur Behandlung von Überreaktionen des Immunsystems aufgrund eines erniedrigten Serotoninspiegels, sowie pharmazeutische Zubereitungen (Präparate) hierfür</p> <p>5. Anspruch : 19 Kombinationspräparat zur Behandlung von Blutungsepisoden</p> <p>6. Anspruch : 20 Kombinationspräparat zur immunsuppressiven Therapie</p> <p>7. Ansprüche: 21-22 DNA-Sequenzen der neuronalen TPH sowie für die Erzeugung serotonin-defizienter Tiere.</p>	

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Fortsetzung von Feld I.2	
Ansprüche Nr.: 1	
<p>Der geltende Patentanspruch 1 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verfahren. In der Tat umfasst er so viele Wahlmöglichkeiten, Veränderliche, mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß er im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheint, als daß er eine sinnvolle Recherche ermöglicht. Daher wurde die Recherche auf den Teil des Patentanspruchs gerichtet, der als klar (und/oder knapp gefaßt) gelten kann, nämlich die Verwendung von Tryptophanhydroxylaseinhibitoren aller Art zur Herabsetzung der Serotoninaktivität/des Serotonininspiegels.</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03178

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2105192	A	23-03-1983	AU BE DE FR IT JP US	8770282 A 894228 A1 3232031 A1 2511869 A1 1153185 B 58065224 A 4444778 A	03-03-1983 16-12-1982 05-05-1983 04-03-1983 14-01-1987 18-04-1983 24-04-1984
US 3686414	A	22-08-1972	KEINE		
US 4994475	A	19-02-1991	AU AU CA DE DE DE DE DK EP EP GB JP JP JP US US US	588365 B2 6260186 A 1273879 A1 3650733 D1 3650733 T2 3686622 D1 3686622 T2 433786 A 0216555 A2 0452765 A2 2181346 A ,B 1942184 C 6067839 B 62061919 A 4835151 A 4918084 A 4738973 A	14-09-1989 12-03-1987 11-09-1990 25-11-1999 04-05-2000 08-10-1992 01-04-1993 12-03-1987 01-04-1987 23-10-1991 23-04-1987 23-06-1995 31-08-1994 18-03-1987 30-05-1989 17-04-1990 19-04-1988

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**